

10/053,482

253,482

JP8-294397-A

**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

(19)【発行国】 日本国特許庁 (J P)	(19)[ISSUING COUNTRY] Japan Patent Office (JP)
(12)【公報種別】 公開特許公報 (A)	(12)[GAZETTE CATEGORY] Laid-open Kokai Patent (A)
(11)【公開番号】 特開平 8-294397	(11)[KOKAI NUMBER] Unexamined Japanese Patent Heisei 8-294397
(43)【公開日】 平成 8 年 (1 9 9 6) 1 1 月 1 2 日	(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION] November 12 (1996. 11.12), Heisei 8
(54)【発明の名称】 免疫学的活性物質の測定方法	(54)[TITLE OF THE INVENTION] The measuring method of an immunological active substance
(51)【国際特許分類第 6 版】 C12Q 1/34 G01N 21/78 33/543 575	(51)[IPC 6] C12Q 1/34 G01N 21/78 33/543 575
【 F I 】 C12Q 1/34 6807-4B G01N 21/78 C 33/543 575	【 FI 】 C12Q 1/34 6807-4B G01N 21/78 C 33/543 575
【審査請求】 未請求	[REQUEST FOR EXAMINATION] No
【請求項の数】 2	[NUMBER OF CLAIMS] 2

【出願形態】 F D	[FORM OF APPLICATION] Electronic
【全頁数】 6	[NUMBER OF PAGES] 6
(21) 【出願番号】 特願平 7-125617	(21)[APPLICATION NUMBER] Japanese Patent Application Heisei 7-125617
(22) 【出願日】 平成 7 年 (1 9 9 5) 4 月 2 7 日	(22)[DATE OF FILING] April 27 (1995. 4.27), Heisei 7
(71) 【出願人】	(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]
【識別番号】 000004341	[ID CODE] 000004341
【氏名又は名称】 日本油脂株式会社	[NAME OR APPELLATION] Nippon Oil & Fats Co., Ltd.
【住所又は居所】 東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 0 番 3 号	[ADDRESS OR DOMICILE]
(72) 【発明者】	(72)[INVENTOR]
【氏名】 榊 秀次郎	[NAME OR APPELLATION] Sakaki, Syuujiro
【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 2 - 2 0 - 3	[ADDRESS OR DOMICILE]
(72) 【発明者】	(72)[INVENTOR]
【氏名】 三谷 元宏	[NAME OR APPELLATION] Mitani, Motohiro

【住所又は居所】
茨城県つくば市梅園 2 - 2 4 -
5

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】
鯉沼 康美

[NAME OR APPELLATION]
Koinuma, Yasumi

【住所又は居所】
茨城県つくば市東新井 3 2 - 1
6

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】
戸谷 義明

[NAME OR APPELLATION]
Toya, Yoshiaki

【住所又は居所】
愛知県刈谷市井ヶ町広沢 1

[ADDRESS OR DOMICILE]

(74) 【代理人】

(74)[AGENT]

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】
高木 六郎 (外 1 名)

[NAME OR APPELLATION]
Takagi, Rokuro (and 1 other)

(57) 【要約】

(57)[ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]

【目的】
糖加水分解酵素標識免疫学
の活性物質の化学発光方法及び
定量法を提供する。

[PURPOSE]
This invention offers the chemoluminescence
procedure of a saccharide hydrolase label
immunological active substance, and an assay

method.

【構成】

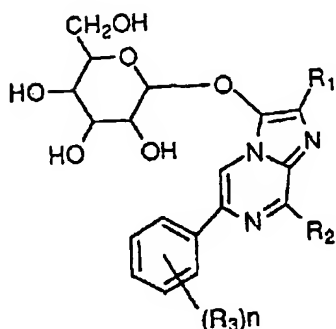
糖加水分解酵素標識免疫学の活性物質を、化学発光基質として一般式（１）

[CONSTITUTION]

In accordance with the present invention, there is provided a chemoluminescence procedure by allowing a saccharide hydrolase label immunological active substance to react with cypridina-luciferin derivative which is expressed with the following general formula (1) as a chemoluminescence matrix.

【化 3】

[FORMULA 3]



（式中 R_1 および R_2 はそれぞれ独立に水素原子、炭素数 1 ～ 20 のアルキル基、炭素数 6 ～ 20 のアリール基、又は炭素数 7 ～ 19 のアリールアルキル基を示し、 R_3 は炭素数 1 ～ 5 のアルキル基、アルコキシ基を示す。 n は 0 ～ 5 の整数を示す）で表わされるウミホタルルシフェリン誘導体と反応させることを特徴とする化学発光方法及

(In the Formula, R_1 and R_2 represent a hydrogen atom, C1-C20 alkyl group, C6-C20 aryl group, or C7-C19 arylalkyl group independently, respectively, R_3 represents a C1-C5 alkyl group or alkoxy group, n represents the integer of 0-5.)

And an assays measuring method of the immunological active substance which is a measurement object in a sample is provided by using this chemoluminescence procedure.

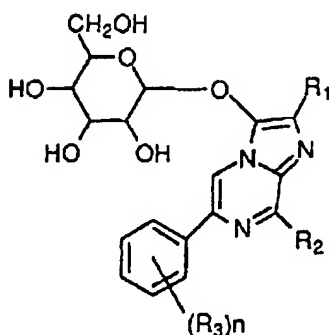
び、この化学発光方法を用いることにより、試料中の測定対象物である免疫学的活性物質を定量することを特徴とする免疫学的活性物質の測定方法である。

【特許請求の範囲】
[CLAIMS]
【請求項 1】

糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質を、化学発光基質として一般式 (1)

[CLAIM 1]

A chemoluminescence procedure which is made a saccharide hydrolase label immunological active substance react with cypridina-luciferin derivative which is expressed with the following general formula (1) as a chemoluminescence matrix.

【化 1】
[FORMULA 1]


(式中 R_1 および R_2 はそれぞれ独立に、水素原子、炭素数 1～20 のアルキル基、炭素数 6～20 のアリール基、又は炭素数 7～19 のアリールアルキル

(In the Formula,

R_1 and R_2 represent a hydrogen atom, C1-C20 alkyl group, C6-C20 aryl group, or C7-C19 arylalkyl group independently, respectively, R_3 represents a C1-C5 alkyl group or alkoxy group,

基を示し、 R_3 は炭素数 1 - 5 のアルキル基、又はアルコキシ基を示す。 n は 0 - 5 の整数を示す) で表わされるウミホタルルシフェリン誘導体と反応させることを特徴とする化学発光方法。

【請求項 2】

糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質と、試料中の測定対象物である免疫学的活性物質との免疫複合体を、請求項 1 記載の化学発光方法を用いることにより、測定対象物を定量することを特徴とする免疫学的活性物質の測定方法。

[CLAIM 2]

A measuring method of the immunological active substance which assays for the immune complex of a saccharide hydrolase label immunological active substance and the immunological active substance which is a measurement object in a sample, by using the chemoluminescence procedure according to Claim 1.

【発明の詳細な説明】**[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]****【0001】****[0001]****【産業上の利用分野】**

本発明は、糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質、または、アビジン標識糖加水分解酵素、あるいはビオチン標識糖加水分解酵素の定量法に関する。本発明の免疫測定方法は各種診断薬に利用される。

[INDUSTRIAL APPLICATION]

This invention relates to the assay method of a saccharide hydrolase label immunological active substance, an avidin label saccharide hydrolase, or a biotin label saccharide hydrolase.

The immunoassay procedure of this invention is utilized for various diagnostics.

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

最近、抗原抗体反応に基づく免疫アッセイの分野においてラジオ免疫アッセイ（RIA）に代わる分析手段として化学発光酵素免疫アッセイ（CLEIA）が注目されている。CLEIAの用いられる代表的な酵素の一つとして、 β -D-ガラクトシダーゼをあげることができる。この β -D-ガラクトシダーゼを化学発光定量するための基質として、アダマンチルジオキセタン誘導体が報告されている（特開平2-180893）。しかしながら、アダマンチルジオキセタン誘導体は分子内に過酸化構造を有するので光及び熱による分解、金属との反応によりレッドックス分解を引き起こし易く、このために定量分析の誤差を招きやすい。また、試料中の測定対象物を測定時に発光させるために、測定液を強アルカリ条件（pHを10以上）にすることが必要であり、しかして、強アルカリでは β -D-ガラクトシダーゼが失活し、強アルカリの廃液が出る欠点がある。

【 0 0 0 3 】

一方、既存のウミホタルルシフェリン誘導体は、1重項酸素、スーパーオキシドアニオン、ヒ

[0002]

[PRIOR ART]

These days, the chemoluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) attracts attention as tools of analysis, with which a radioimmunoassay (RIA) is replaced, in the field of the immunoassay based on an antigen antibody reaction. As one of the typical enzymes with which CLEIA is used, it can mention a (beta)-D-galactosidase. The adamantyl dioxatane derivative is reported as a matrix for carrying out the chemoluminescence assay of this (beta)-D-galactosidase

(Unexamined-Japanese-Patent No. 2-180893). However, since the adamantyl dioxatane derivative has the peroxide structure in the molecule, it tends to cause redox decomposition by the degradation by the light and heat, and reaction with a metal, and for this reason it tends to cause the error of quantitative analysis.

Moreover, in order to make the measurement object in a sample emit light at measuring time, it is required to make measurement liquid into strong-base conditions (for it to be pH 10 or more).

Thus, a (beta)-D-galactosidase deactivates in a strong base, there is a disadvantage out of which the waste liquid of a strong base comes.

[0003]

On the other hand, the existing cypridina-luciferin derivative reacts selectively with active oxygens, such as singlet oxygen, a

ドロキシラジカル等の活性酸素と選択的に反応し、発光することからこれら活性酸素の微量定量に有効であることが知られている。しかしながら酵素により発光させることはできない。また本発明のウミホタルルシフェリン誘導体と類似の構造を有するイワシルシフェリンが知られている [Inoue, S. ら Chem. Lett. 417-8(1987)]。しかしながら、これは、グルクロニダーゼという特殊な酵素でのみ発光するに過ぎない。

【 0 0 0 4 】

そこで、一般の臨床検査試薬でも用いられている、 β -D-ガラクトシダーゼ等の糖加水分解酵素標識抗体等を用いた、温和な中性領域での免疫学的活性物質の定量が強く望まれている。

【 0 0 0 5 】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明が解決しようとする課題は、高感度、高精度、簡便かつ温和な条件下で、糖加水分解酵素標識抗体、あるいは糖加水分解酵素標識抗原を用いた、免疫学的活性物質の測定方法を提供することである。

superoxide anion, and a hydroxyl radical, since light is emitted, it is known that it is effective in the microdetermination of these active oxygen. However, it cannot make light emit with an enzyme.

Moreover, it is known that the sardine luciferin has the structure similar to the cypridina-luciferin derivative of this invention.

[Inoue, S. et al. Chem. Lett. 417-8 (1987).]

However, this only emits light only with a special enzyme called a glucuronidase.

[0004]

Then, an assay of the immunological active substance in the mild neutral condition using saccharide hydrolysis enzyme labeled antibodies, such as a (beta)-D-galactosidase used also in the common clinical-examination test, etc. is desired strongly.

[0005]**[PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION]**

The problem to be solved by this invention is accordingly to offer the measuring method of an immunological active substance which is a high-sensitivity, highly accurate, is able to perform under mild and conventional conditions, using a saccharide hydrolysis enzyme labeled antibody or a saccharide hydrolase label antigen.

【 0 0 0 6 】

[0006]

【課題を解決するための手段】

本発明によれば、糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質を、化学発光基質として、一般式(1)

【MEANS TO SOLVE THE PROBLEM】

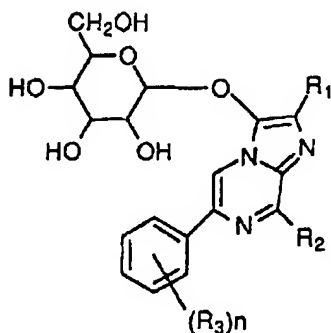
According to this invention, it is offered that a chemoluminescence procedure which is made a saccharide hydrolase label immunological active substance react with cypridina-luciferin derivative which is expressed with the following general formula (1) as a chemoluminescence matrix.

【 0 0 0 7 】

[0007]

【化2】

[FORMULA 2]



(式中 R_1 および R_2 はそれぞれ独立に、水素原子、炭素数1～20のアルキル基、炭素数6～20のアリール基、又は炭素数7～19のアリーラルキル基を示し、 R_3 は炭素数1～5のアルキル基、又はアルコキシ基を示す。 n は0～5の整数を

(In the Formula,

R_1 and R_2 represent a hydrogen atom, a C1-C20 alkyl group, a C6-C20 aryl group, or a C7-C19 arylalkyl group independently, respectively, R_3 represents a C1-C5 alkyl group or an alkoxy group, n represents the integer of 0-5.)

示す) で表わされるウミホタル
ルシフェリン誘導体と反応させ
ることを特徴とする化学発光方
法が提供される。

【0008】

また、本発明によれば、糖加水
分解酵素標識免疫学的活性物質
と、試料中の測定対象物である
免疫学的活性物質との免疫複合
体を、前記の化学発光方法を用
いることにより、測定対象物を
定量することを特徴とする免疫
学的活性物質の測定方法が提供
される。

[0008]

Moreover, according to this invention, it is offered that a measuring method of the immunological active substance which assays for the immune complex of a saccharide hydrolase label immunological active substance and the immunological active substance, which is a measurement object in a sample, by using the above mentioned chemoluminescence procedure.

【0009】

以下、本発明を更に詳細に説明
する。本発明において、免疫学
的活性物質は抗体または抗原を
意味する。本発明で用いる糖加
水分解酵素標識免疫学的活性物
質における糖加水分解酵素とし
ては、例えば、 α -D-グルコ
シダーゼ、 β -D-グルコシダ
ーゼ、 α -D-ガラクトシダー
ゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ
等を挙げることができる。

[0009]

Hereafter, this invention is demonstrated in greater detail.
In this invention, an immunological active substance implies an antibody or an antigen.
As the saccharide hydrolase in the saccharide hydrolase label immunological active substance which is used by this invention, for example, it can mention an (alpha)-D-glucosidases, a (beta)-D-glucosidases, an (alpha)-D-galactosidase, a (beta)-D-galactosidase, etc.

【0010】

糖加水分解酵素標識免疫学的活
性物質において、免疫学的活性
物質である抗体は各種抗原に対
する全ての抗体を使用すること
ができる。また、糖加水分解酵

[0010]

In a saccharide hydrolase label immunological active substance, the antibody which is an immunological active substance can use all the antibodies with respect to various antigens.
Moreover, in a saccharide hydrolase label

素標識免疫学的活性物質において、免疫学的活性物質である抗原は、各種抗体に対する全ての抗原を使用することができる。抗体は、例えば、各種ステロイドホルモンに対する抗体、各種腫瘍マーカーに対する抗体、各種感染症に対する抗体、各種ペプチドホルモンに対する抗体、その他各種抗体などである。

immunological active substance, all the antigens with respect to various antibodies can be used for the antigen which is an immunological active substance.

Antibodies are, for example, the antibody with respect to various steroid hormones, an antibody with respect to various tumor markers, an antibody with respect to various infectious diseases, an antibody with respect to various peptide hormones, other various antibodies, etc..

【0011】

前記において、ステロイドホルモンとしては、例えば、 T_4 、 T_3 、 T_3 U、TSH、TGR、 FT_4 、 FT_3 、サイクログロブリン、コルチゾール、エストラジオール、エストリオール、プロゲステロン、テストステロン、17-OHP、エストロゲンなどが挙げられる。

[0011]

In the above, as steroid hormones, it is, for example, T_4 , T_3 , T_3 U, TSH, TGR, FT_4 , FT_3 , cyclo globulin, cortisol, estradiol, estriol, progesterone, testosterone, 17-OHP, and estrogen, etc. are mentioned.

【0012】

腫瘍マーカーとしては、例えば、CEA、AFP、 β 2-M、フェリチン、SCC、PAP、SPan、 γ -Sm、CA19-9、CA125、CA50、NSE、PSA、TPAなどが挙げられる。

[0012]

As a tumor marker, for example, CEA, AFP, (beta)2-M, ferritin, SCC, PAP, SPan, (gamma)-Sm, CA19-9, CA125, CA50, NSE, PSA, and TPA, etc. are mentioned.

【0013】

感染症としては、例えば、HAAb、HA(1gM)Ab、HBsAb、HBsAg、HBeAb、HBcAg、HBcAb、HBc(1gM)Ab、

[0013]

As infectious disease, they are, for example, HAAb, HA(1gM)Ab, HBsAb, HBsAg, HBeAb, HBcAg, HBcAb, HBc(1gM)Ab, HDVAb, HIV, CMV, ATL, RSV, German measles, Chlamydia

HDVAb、HIV、CMV、ATL、Ab、Neisseria gonorrhoeae, syphilis, and RSV、風疹、クラミディア Ab、mycoplasma, etc. are mentioned.
淋菌、梅毒、マイコプラズマなどが挙げられる。

【0014】

ペプチドホルモンとしては、例えば、PTH、PRL、インスリン、グリカゴン、ガストリン、FSH、LH、HCG、PF₄、セクレチン、C-ペプチド、PSTI、カルトシン、ソマトメジン、HGH、ACTH、ADHなどが挙げられる。

[0014]

As a peptide hormone, they are for example, PTH, PRL, insulin, glycagon, gastrins, FSH, LH, HCG, PF₄, secretin, C-peptide, PSTI, calcitonin, somatomedin, HGH, ACTH, and ADH etc. are mentioned.

【0015】

薬剤としては、例えば、フェニトイン、フェノバルビタール、カルバマゼピン、バルプロ酸、プリミドン、エトサキシミド、トブラマイン、リドカイン、プロカインアミド、NAPA、ゲンタマイシン、カナマイシン、ジベカシン、ストレプトマイシン、ネチルマイシン、アミカシン、ジゴキシン、ジギトキシン、キシジン、テオフィリン、メソレキセート、アセトアミノフェン、サリチル酸、シクロスポリンなどが挙げられる。

[0015]

As a medicine, they are, for example, phenytoin, phenobarbital, carbamazepine, valproic acid, primidone, ethosuximide, tobramycin, lidocaine, procaine amido, NAPA, gentamycin, kanamycin, dibekacin, streptomycin, netilmicin, amikacin, digoxin, digitoxin, xijin, theophylline, methorexate, acetaminophen, salicylic acid, and cyclosporin, etc. are mentioned.

【0016】

その他の抗体としては、例えば、IgE、アルゲニン特異 IgE、CK-MB、免疫複合体 (C3d-、C1q-)、ミオグロビン、IgG、

[0016]

As another antibody, for example, IgE, allergen specific IgE, CK-MB, immune complex (C3d-, C1q-), myoglobin, IgG, IgA, IgM, C3, C4, anti-thyroglobulin antibody, anti-microsome

IgA、IgM、C3、C4、抗サイクロブロブリン抗体、抗マイクロソーム抗体、RF、ANA、便潜血、D-ダイマー、ヒスタミンなどが挙げられる。

antibody, RF, ANA, fecal occult blood, D-dimer, and histamine, etc. are mentioned.

【0017】

本発明で用いる、ウミホタルルシフェリン誘導体は、前記一般式(1)で表わされる。式中 R_1 および R_2 の具体例として、例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル基、 t -ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、トリデシル基、ヘキサデシル基、イコシル基等の直鎖状または分岐鎖状の炭素数1~20のアルキル基；フェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基、ナфтаセニル基、ピレニル基、ペリレニル基等の炭素数6~20のアリール基；ベンジル基、フェネチル基、ジフェニルメチル基、トリチル基、トリル基、キシリル基、クメニル基、メシチル基等の炭素数7~19のアリールアルキル基を挙げることができる。 R_1 と R_2 とは同一であっても、異なってもよい。式中 R_3 の具体例として、例えばメチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、イソブ

[0017]

The cypridina-luciferin derivative which is used by this invention is expressed with said General formula (1).

In the Formula, an example of R_1 and R_2 can be mentioned as following, for example, linear or branched C1-C20 alkyl groups such as methyl group, ethyl group, n -propyl group, isopropyl group, n -butyl group, such as an isobutyl group, t -butyl group, pentyl group, hexyl group, heptyl group, octyl group, nonyl group, decyl group, tri-decyl group, hexadecyl group, and icosyl group;

C6-C20 aryl groups such as phenyl group, naphthyl group, anthryl group, phenanthryl group, naphthacenyl group, pyrenyl group, and perylenyl group;

C7-C19 arylalkyl groups such as benzyl group, phenethyl group, diphenyl methyl group, trityl radical, tolyl group, xylyl group, cumenyl group, and mesityl group.

Even if R_1 and R_2 are the same, they are may be different.

In the Formula, an example of R_3 can be mentioned as following, for example, alkyl groups such as methyl group, ethyl group, n -propyl group, isopropyl group, n -butyl group, isobutyl group, and t -butyl group;

alkoxy groups such as methoxy group, ethoxy group, n -propoxy group, isopropoxy group, n -

チル基、*t*-ブチル基等のアルキル基；メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、イソプロポキシ基、*n*-ブトキシ基、イソブトキシ基、*t*-ブトキシ基等のアルコキシ基を挙げることができる。但しこれらに限定されない。

butoxy group, isobutoxy group, and *t*-butoxy group.

However, it is not limited to these.

【0018】

化学発光させる際の pH は、一般に pH 4－10 の範囲であることが好ましく、更に、糖加水分解酵素の活性が維持されている範囲を選択することが好ましい。前記の pH の調製は、公知の緩衝溶液あるいは各種生理食塩水などで行うことが可能であり、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液などを挙げることができる。また、これらの溶液に Tween 20 (ICI 社商標) などの界面活性剤またはジメチルスルオキシド、テトラヒドロフラン、*N,N*-ジメチルホルムアミド、メタノール、あるいはエタノールなどの有機溶媒を 0.01～50% 添加してもよく、好ましくは、糖加水分解酵素の活性が低下しないような、0.05～20% 添加してもよい。

[0018]

As for pH at the time of carrying out the chemoluminescence, it is desirable that it is generally the range of pH4-10, and it is desirable to choose further the range in which the activity of the saccharide hydrolase is maintained.

The preparation of the above-mentioned pH can be performed by the public known buffer solution or various physiological saline etc., for example, phosphate buffer, acetic-acid buffer, carbonic acid buffer, and citrate buffer solution, etc is mentioned.

Moreover, to these solutions, it is sufficient to add surface active agents such as Tween20 (ICI trademark), or organic solvents such as dimethyl sulfoxide, tetrahydrofuran, *N,N*-dimethylformamide, methanol, and ethanol. It is sufficient to add 0.01 to 50%, preferably 0.05 to 20% to which the activity of a saccharide hydrolase does not fall.

【0019】

前記化学発光反応を行う際の温度は一般に 0～70℃の範囲で

[0019]

As for the temperature at the time of performing said chemoluminescence reaction, it is

あることが好ましく、特に糖加水分解酵素の活性が低下しないような15～60℃の範囲であることが好ましい。

【0020】

糖加水分解酵素標識免疫学的活性物質と、試料中の測定対象物である免疫学的活性物質との免疫複合体は、更に、該測定対象物と反応する各種抗体、各種抗原あるいは各種蛋白質など、または、該測定対象物と反応する各種固相化抗体、各種固相化抗原あるいは各種固相化蛋白質と結合していても良い。固相は特に限定されないが、好ましくは、タイタープレート、ポリスチレンラテックス、ポリスチレンビーズ、ガラスビーズ、ガラスチューブ、ポリステレンチューブ、磁気微粒子、鉄微粒子などを挙げることができ、特に好ましくは、タイタープレート、ポリスチレンラテックス、磁気微粒子を挙げることが出来る。

【0021】**【発明の効果】**

本発明の化学発光方法および免疫測定方法は、高感度、高精度、簡便かつ温和な条件下で、糖加水分解酵素標識抗体、あるいは糖加水分解酵素標識抗原を用いて、試料中の測定対象物である

generally desirable in the range of 0 - 70 degrees C, and it is particularly desirable in the range of 15 - 60 degrees C to which the activity of a saccharide hydrolase does not fall.

[0020]

Immune complex of a saccharide hydrolase label immunological active substance and the immunological active substance which is a measurement object in a sample, furthermore, it is sufficient to combine with this measurement object and the reacting substances such as the various antibodies, various antigens and various proteins, or the reacting solid phase substances such as various solid phase antibodies, various solid phase antigens and various immobilization proteins.

Although a solid-phase in particular is not limited, preferably it can mention titer plate, polystyrene latex, polystyrene beads, glass bead, glass tube, polystyrene tube, magnetic microparticles, iron microparticles, etc., most preferably, it can mention titer plate, polystyrene latex, and magnetic microparticles.

[0021]**[ADVANTAGE OF THE INVENTION]**

The chemoluminescence procedure and the immunoassay procedure of this invention can perform the assay measurement of immunological active substance which is a high-sensitivity, highly accurate, is able to perform under mild and conventional

免疫学的活性物質を定量することが出来る。

conditions, using a saccharide hydrolysis enzyme labeled antibody or a saccharide hydrolase label antigen.

【 0 0 2 2 】

[0022]

【実施例】

以下本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[EXAMPLES]

Based on an Example, it demonstrates this invention concretely below.

This invention is not limited to these.

【 0 0 2 3 】

参考例：ウミホタルルシフェリン誘導体の合成

[0023]

Reference Example: Synthesis of the cypridina-luciferin derivative

【参考例 1】

6- (4-メトキシフェニル)-2-メチルイミダゾ [1, 2-a] ピラジーン-3-オン 0.1 g (0.35 mmol) と、リン酸二ナトリウム 1.1 g (7.75 mmol) の混合物中に、アセトニトリル 5 ml およびベンゼン 9 ml を加えた後、モレキュラーシーブ 4 A 2.6 g を加え室温で 1 時間攪拌した。続いて 2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- α -D-ガラクトピラノシルブロミド 0.18 g (0.45 mmol) とトリフルオロメタンスルホン酸銀 0.37 g (1.43 mmol) を加えて、窒素雰囲気下室温で 2 時間攪拌した。セライトを敷いたガラスフィルターにて反応溶液を濾過し、残渣をア

[REFERENCE 1]

After adding acetonitrile 5 ml and benzene 9 ml to the mixture of 6-(4-methoxyphenyl)-2-methyl imidazo [1,2-a] pyrazine-3-on 0.1g (0.35 mmol) and phosphoric-acid disodium 1.1 g(7.75 mmol), molecular sieve 4 A 2.6g was added further and stirred at room temperature for 1 hour. Then, 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-(α)-D-galactopyranosyl bromide 0.18g (0.45 mmol) and trifluoro methanesulfonic acid silver 0.37g (1.43 mmol) was added and stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 2 hours.

The reaction solution was filtrated with the glass filter which covered with cerite, the residue was washed by acetonitrile and benzene.

After distilling off the solvent of filtrate and washings, 15 ml of methylene chloride and 10 ml of an aqueous saturated solution of sodium hydrogencarbonate-sodium chloride was

セトニトリルおよびベンゼンにて洗浄した。濾液および洗液の溶媒を留去した後、塩化メチレン 15 ml 及び飽和炭酸水素ナトリウム-食塩水 10 ml を加え、攪拌し、不溶物をガラスフィルターにて取り除いた。濾液の塩化メチレン層を分離した後、硫酸ナトリウムにて乾燥を行った。溶媒を留去後、得られた油状物をシリカゲルカラム (30% アセトン-ベンゼン) および中圧カラムクロマトグラフィにて精製すると、目的の 6-(4-メトキシフェニル)-2-メチル-3-(テトラ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシルオキシ) イミダゾ [1,2-a] ピラジンが収量 0.08 g (0.14 mmol)、収率 39% で得られた。

【0024】

スペクトルデータを以下に示す。

MS(FAB): 586 (M+H)⁺, 256
 Exact MS: 586.1995;
 Calcd for C₂₈H₃₂O₁₁N₃: 586.2037

【0025】

参考例 2

6-(4-メトキシフェニル)-2-メチル-3-(テトラ-O-アセチル-β-D-ガラク

added to the residue and stirred, then the insoluble matter was removed by filtration with glass filter.

After separating the methylene chloride layer of a filtrate, it was dried with the sodium sulfate.

After distilling off the solvent, the obtained oily matter was purified by a silica-gel column (30% acetone-benzene) and medium-pressure column chromatography. The target material of 6-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-3-(tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl oxy) imidazo [1,2-a] pyrazine was obtained with the yield of 0.08g (0.14 mmol) and 39%.

[0024]

Spectrum data are shown below.

MS(FAB): 586 (M+H)⁺, 256
 Exact MS: 586.1995;
 Calcd for C₂₈H₃₂O₁₁N₃: 586.2037

[0025]

Reference Example 2

After adding methanol 3.5 ml and 1.8 ml of concentrated-ammonia water to 0.05g (0.09 mmol) of 6-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-

トピラノシルオキシ) イミダゾ
 [1, 2-a] ピラジン 0.0
 5 g (0.09 mmol) にメタノール
 3.5 ml と濃アンモニア水 1.
 8 ml を加えた後、40℃で6時
 間30分攪拌した。白色沈澱を
 濾取し、メタノールから再結晶
 を行うと目的の3-(β-D-
 ガクトピラノシルオキシ)-6
 -(4-メトキシフェニル)-
 2-メチルイミダゾ [1, 2-
 a] ピラジンが 0.03 g (0.0
 7 mmol) 収率78%で得られ
 た。

3-(tetra- O- acetyl- (beta)-D-galactopyranosyl
 oxy) imidazo [1,2-a] pyrazine, it was stirred at
 40 degrees C for 6 hours and 30 minutes.
 The white precipitation was obtained by filtration
 and recrystallization was performed from
 methanol. The target material of
 3-((beta)-D-galactopyranosyl
 oxy)-6-(4-methoxyphenyl)-2-methyl imidazo [1,
 2-a] pyrazine was obtained with yield of 0.03g
 (0.07mmol) and 78%.

【0026】

スペクトルデータを以下に示
 す。
 MS(FAB): 418 (M+H)⁺

[0026]

Spectrum data are shown below.
 MS(FAB): 418 (M+H)⁺

【0027】

実施例

タイタープレート (Maxisorp
 F16 Black; NUNC 社) の16ウ
 エルの各々に、100mM リン
 酸緩衝液 (pH7.5) に溶解した
 5.0 μg/ml の Goat Anti
 Mouse 1gG を100 μ加えて、
 4℃で12時間インキュベート
 した。インキュベート終了後、
 各16ウェルを、0.5% Tween
 20、150mM NaCl を添加し
 た10mM リン酸緩衝液 (pH7.
 5) で3回洗浄した。その後、
 5% ウシ血清アルブミン、0.
 5% Tween 20、150mM

[0027]

Example

To each of 16 wells of a titer plate (Maxisorp
 F16 Black; NUNC Company), 5.0
 microgram(s)/ml Goat Anti Mouse 1gG
 dissolved in a 100-mM phosphate buffer
 (pH7.5) was added, and it was incubated at 4
 degrees C for 12hours. After the completion of
 incubation, each 16 wells was washed 3 times
 by 10 mM phosphate buffer solution (pH7.5)
 which was added 0.5% Tween 20 and 150 mM
 NaCl. Then 300 microliter of 10 mM phosphate
 buffer solution (pH7.5) which was added 5%
 bovine serum albumin, 0.5% Tween 20, and
 150 mM NaCl was added to each well and it
 was incubated at 25 degrees C for 2 hours.

NaCl を添加した 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) 溶液を各ウェルに 300 μ l 加えて、25°C で 2 時間インキュベートした。インキュベート終了後、各ウェルの溶液をデカンテーションにより除去した。その後、5% ウシ血清アルブミン、0.5% Tween 20、150 mM NaCl を添加した 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解した、0 fmol/ml、2 fmol/ml、10 fmol/ml、50 fmol/ml、250 fmol/ml、1250 fmol/ml の Mouse IgG の 6 種の各濃度を各ウェルに 100 μ l 加えて、25°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート終了後、各ウェルを、0.5% Tween 20、150 mM NaCl を添加した 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) で 3 回洗浄した。その後、ウシ血清アルブミン、0.5% Tween 20、150 mM NaCl を添加した 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) で 1000 倍希釈した、 β -ガラクトシダーゼ標識 anti mouse IgG (AMERICAN QUALEX 社) を各 16 ウェルに 100 μ l 加えて、25°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート終了後、各ウェルを、0.5% Tween 20、150 mM NaCl を添加した 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) で 3 回洗浄した。

After the completion of incubation, the solution of each well was removed by the decantation.

After that, to each well, 100 microliter of six sorts of each concentration of Mouse IgG (0 fmol/ml, 2 fmol/ml, 10 fmol/ml, 50 fmol/ml, 250 fmol/ml, and 1250 fmol/ml) which was dissolved in 10 mM phosphate buffer solution (pH7.5) adding the 5% bovine serum albumin and 0.5% Tween 20 was added and it was incubated at 25 degrees C for 30 minutes. After the completion of incubation, each well was washed 3 times by 10 mM phosphate buffer solution (pH 7.5) which was added 0.5% Tween 20 and 150 mM NaCl. After that, to each 16 well, 100 microliter of (beta)-galactosidase label anti mouse IgG (AMERICAN QUALEX Company) which was diluted 1000 times with the 10-mM phosphate buffer solution (pH7.5) adding the bovine serum albumin, 0.5% Tween 20, and 150 mM NaCl was added and it was incubated at 25 degrees C for 30 minutes.

After the completion of incubation, each well was washed 3 times by the 10-mM phosphate buffer solution (pH7.5) which was added 0.5% Tween 20 and 150 mM NaCl.

After that, to each well, 100 microliter of the mixture solution of 1 volume of dimethyl sulfoxide solution containing 100 microM of 3-((beta)-D-galactopyranosyl oxy)-6-(4-methoxyphenyl)-2-methyl imidazo [1,2-a] pyrazine which was obtained with Reference Example 2 and 9 volume of 200 mM phosphate buffer solution (pH8.0) adding 1 mM MgCl₂ was added.

It was incubated at 35 degrees C for 10 minutes, then each well was measured for 10

その後、参考例 2 にて得られた、
 100 μ M 3- (β -D-ガラクトピラノシルオキシ)-
 - (4-メトキシフェニル)-
 2-メチルイミダゾ [1, 2-a] ピラジンのジメチルスルホ
 キシド溶液 1 容及び 1 mM
 MgCl₂ を添加した、200 mM
 リン酸緩衝液 (pH8.0) 9 容を
 混合した溶液を、各ウェルに 1
 00 μ l 添加して、35℃で 1
 0 分間インキュベートした後、
 LUMINOUS CT-900D (ダイアヤ
 トロン社) にて各ウェルを 10
 秒間測定して、発光カウントを
 数を求めた。各濃度の測定カウ
 ント数、平均値、SD、CV 値 (%)
 は表 1 に示した。

seconds in LUMINOUS CT-900D (Dia-latron
 Co., Ltd.), and the luminescence count number
 was obtained.

The measurement count number at each
 concentration, a mean value, SD, and CV value
 (%) were shown in Table 1.

【0028】

[0028]

【表 1】

表 1 測定カウント
 数、平均値、SD、CV 値 (%)

Mouse IgG			
0	2		
10	50	250	
1250			

(fmol/ml)			
89	97		

【TABLE 1】

Table 1 Measurement count number, mean
 value, SD, CV value (%)

Mouse IgG				
0	2	10		
50	250	1250		

(fmol/ml)				
89	97	100	123	217
330				
96	90	97	124	212

100	123	217	313				
330							
	96	90					
97	124	212					
313							
	93	91	93	91	95	115	206
95	115	206	333				
333		85	85	85	88	122	218
	85	85	314				
88	122	218	78	77	89	113	224
314			332				
	78	77	80	79	82	125	212
89	113	224	360				
332							
	80	79					
82	125	212					
360							
	78	79	78	79	80	129	222
80	129	222	361				
361		68	75	79	108	284	
	68	75	391				
79	108	284	94	91	97	132	231
391			372				
	94	91	92	88	88	110	214
97	132	231	362				
372							
	92	88					
88	110	214					
362							
	92	92	92	92	80	115	243
80	115	243	387				
387		83	86	90	111	224	
	83	86	346				

90	111	224	93	71	94	117	217
346			346				
	93	71	76	80	91	119	224
94	117	217	371				
346							
	76	80					
91	119	224					
371							
	76	75	76	75	94	117	224
94	117	224	423				
423			76	80	86	121	241
	76	80	370				
86	121	241	-----				
370			Mean value		84.3		83.5
			89.4	118.8	225.8	356.9	

平均值	84.3	83.5
89.4	118.8	225.8
356.9		

S	D	8.5	7.5	S	D	8.5	7.5	6.6	6.8
6.6		6.8	18.4	18.4		29.4			
29.4				CV value (%)		10.1		9.0	7.4
CV 値 (%)	10.1	9.0	5.8	8.2		8.3			
7.4	5.8	8.2	-----						
8.3			As is clear from Table 1, according to this						

invention it can measure to 50 fmol/ml.

表 1 より 5 0 fmol/ml まで測定
可能であることは明らかである。

【 0 0 2 9 】

[0029]

比較例

実施例の 100 μ M 3- β -D-ガラクトピラノシルオキシ)-6-(4-メトキシフェニル)-2-メチルイミダゾ[1,2-a]ピラジンの代わりに、25 mM 2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド水溶液を用いて 35°C で 10 分間インキュベート終了後、200 mM の炭酸ナトリウム溶液を各ウェルに 100 μ l 添加した後、マイクロプレートリーダー (DINATEC 社) にて各ウェルの 410 nm での吸光度を求めた。各濃度の測定カウント数、平均値、SD、CV 値 (%) は表 2 に示した。

Comparative Example

Instead of 100 micronM 3-((beta)-D-galactopyranosyl oxy)-6-(4-methoxyphenyl)-2-methyl imidazo [1,2-a] pyrazine of an Example, 25-mM 2-nitrophenyl-(beta)-D galactopyranoside aqueous solution was used, and after the completion of incubation at 35 degrees C for 10 minutes, 100 microliter of 200 mM sodium-carbonate solution was added to each well. After that, the absorbence of each well was measured at 410 nml by the microplate reader (Dynatec Inc.). The measurement count number of each concentration, a mean value, SD, and CV value (%) were shown in Table 2.

【0030】

[0030]

【表 2】

表 2 測定カウント数、平均値、SD、CV 値 (%)

Mouse IgG	0	2	
10	50	250	
1250			

(fmol/ml)			
	0.044	0.042	

[TABLE 2]

Table 2 Measurement count number, mean value, SD, CV value (%)

Mouse IgG	0	2	10
50	250	1250	

(fmol/ml)					
	0.044	0.042	0.085	0.095	0.274
	0.48				
	0.055	0.062	0.062	0.111	0.303

0.085	0.095	0.274	0.53				
0.48							
	0.055	0.062					
0.062	0.111	0.303					
0.53							
	0.068	0.074	0.068	0.074	0.064	0.093	0.303
0.064	0.093	0.303	0.584				
0.584			0.055	0.085	0.107	0.094	0.297
	0.055	0.085	0.594				
0.107	0.094	0.297	0.056	0.065	0.053	0.095	0.297
0.594			0.616				
	0.056	0.065	0.064	0.068	0.079	0.093	0.286
0.053	0.095	0.297	0.517				
0.616							
	0.064	0.068					
0.079	0.093	0.286					
0.517							
	0.03	0.064	0.03	0.064	0.059	0.125	0.247
0.059	0.125	0.247	0.558				
0.558			0.064	0.03	0.067	0.094	0.315
	0.064	0.03	0.549				
0.067	0.094	0.315	0.047	0.056	0.062	0.099	0.271
0.549			0.461				
	0.047	0.056	0.079	0.068	0.098	0.108	0.279
0.062	0.099	0.271	0.513				
0.461							
	0.079	0.068					
0.098	0.108	0.279					
0.513							
	0.064	0.083	0.064	0.083	0.068	0.096	0.32
0.068	0.096	0.32	0.522				
0.522			0.053	0.056	0.086	0.095	0.264
	0.053	0.056	0.549				

0.086	0.095	0.264	0.068	0.04	0.074	0.12	0.31
0.549			0.484				
	0.068	0.04	0.056	0.082	0.065	0.121	0.31
0.074	0.12	0.31	0.616				
0.484							
	0.056	0.082					
0.065	0.121	0.31					
0.616							

	0.062	0.064	0.062	0.064	0.101	0.094	0.269
0.101	0.094	0.269	0.539				
0.539			0.02	0.026	0.059	0.093	0.274
	0.02	0.026	0.573				
0.059	0.093	0.274	-----				
0.573			Mean value		0.0553		0.0603
			0.0743	0.1016	0.2887	0.5428	

平 均 値	0.0553
0.0603	0.0743
0.2887	0.5428

S	D	0.0147	S	D	0.0147	0.0180	0.0166	0.0114
0.0180	0.0166	0.0114	0.0211	0.0466				
0.0211	0.0466		CV value (%)	26.6	29.8	22.3		
C V 値 (%)	26.6	29.8	11.2	7.3	8.6			
22.3	11.2	7.3	-----					
8.6			As is clear from Table 2, it can measure to 50					

250 fmol/ml.

表 2 より 2 5 0 fmol/ml まで測定可能であることは明らかである。

THOMSON SCIENTIFIC TERMS AND CONDITIONS

Thomson Scientific Ltd shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Thomson Scientific translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Thomson Scientific Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our website: ["www.THOMSONDERWENT.COM"](http://www.THOMSONDERWENT.COM) (English)
["www.thomsonscientific.jp"](http://www.thomsonscientific.jp) (Japanese)